УДК: 619:616.98:578.833.314

Колбасов Д.В., Белянин С.А., Рыжова Е.В., Пронин В.В., Корнева Г.В.
(ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии, Ивановская государственная сельскохозяйственная академия им. академика Д.К. Беляева)

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ И СЕЛЕЗЕНКЕ У ДИКИХ СВИНЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Ключевые слова: африканская чума свиней, дикие свиньи (кабаны), иммуногистохимические изменения, В – лимфоциты.

Введение

Африканская чума свиней (АЧС), так же известная, как африканская лихорадка, болезнь Монтгомери – это легко передающаяся вирусная болезнь домашних и диких свиней. Согласно Международной классификации заразных болезней животных (OIE), данная болезнь относится к списку А, протекает в форме эпизоотии, при которой болезнь способна к широкому распространению, охватывающему все поголовье свиней хозяйства, района, области, страны, что приводит к огромному экономическому ущербу в сельском хозяйстве.

Впервые африканская чума свиней зарегистрирована в 1903 году в Южной Африке. В середине прошлого века она была занесена с Черного континента в страны Европы, затем попала в Советский Союз. Тогда очаги заражения удалось быстро ликвидировать. В настоящее время для Российской Федерации эпизоотическая ситуация по АЧС более критичная и напряженная [1,2,3,4].

Первые вспышки африканской чумы свиней в России были отмечены в конце 2007 года в Шатойском районе Чечни. Затем чума охватила Южный, Северо-Кавказский федеральные округа и продолжала продвигаться на север. С 2007 года АЧС зарегистрирована на территории 24 субъектов РФ, в стране выявлено около 254 неблагополучных пунктов и 37 инфицированных вирусом объектов. При ликвидации очагов АЧС уничтожено более 440 тысяч голов свиней[2,3].

Анализ источников распространения АЧС показал, что основную роль в продвижении болезни играют два фактора: распространение заболевания в популяции диких свиней и пищевые отходы, скармливаемые свиньям. Наибольшую опасность в распространении АЧС представляет миграция диких свиней (кабанов), т.к. для диких животных не существует границ между регионами и невозможен постоянный контроль популяций диких животных[1].

С точки зрения патогенеза заболевания, при АЧС первичная репликация вируса происходит в моноцитах и макрофагах лимфатических узлов, расположенных недалеко от места проникновения вируса. Вначале вирус инфицирует моноциты и макрофаги миндалин, нижнечелюстных, околоушных и мезентеральных лимфатических узлов, затем с кровью и лимфой распространяется во вторичные места репликации – селезенку, костный мозг, лимфатические узлы, легкие, печень и почки – и вызывает дистрофические и некротические изменения в этих органах.

По мере развития морфологических изменений в лимфатических узлах, селезенке наблюдаются процессы ингибирования пролиферации лимфоидных структур и массивный кариопикноз и кариорексис лимфоцитов и клеток ретиколоэндотелия, что является характерным для африканской чумы признаком. Независимо от путей проникновения вируса, постоянно отмечаются изменения в селезенки и лимфатических узлах желудка, печени, почек [2,3,4].

Исходя из этого перед нами была поставлена задача: выявить основные иммуногистохимические изменения в лимфатических узлах и селезенке при экспериментальном инфицировании диких свиней высоковирулентным полевым изолятом вируса АЧС второго генотипа, выделенным в Республике Чечня.

Материалы и методы.

1. Дикие свиньи европейского подвида живой массой 40-50 кг. – 4 животных, полу-

чены из национального парка «Завидово» Тверской области Российской Федерации.

2. Изолят вируса АЧС №154/20, выделенный в 2009 г. от павшего кабана в ст. Калиновская, Наурского района Республики Чечня с инфекционной активностью 6,0 lgГАЕ50/см3. Данный изолят вируса паспортизирован и в настоящее время его используют в ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, г. Покров при проведении фундаментальных и прикладных НИОКР.

3. Моноклональные антитела Ki – 67 (фирма «DAKO»).

Одного кабана (№1) инфицировали внутримышечно изолятом вируса АЧС №154/20 (экстрактом 10%-ной суспензии селезенки) в объеме 2 см3. Остальные животные (№№2,3,4) находились в одном боксе на контакте с внутримышечно инфицированным кабаном (№1).

В течение эксперимента ежедневно проводили клинический осмотр животных. Для гистологического и иммуногистохимического исследований отбирали пробы соматических (нижнечелюстных и предлопаточных), а также висцеральных (портальных, желудочных и почечных) лимфатических узлов. Весь отобранный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, уплотняли в парафине, изготавливали срезы толщиной 4 – 5 мкм на роторном микротоме.

Для гистологического исследования препараты окрашивали гематоксилином и эозином, изучали под микроскопом Leica DM1000, микрофотографирование осуществляли с помощью цифрового аппарата Leica DMB.

Иммуногистохимическое исследование (определение пролиферативной активности клеток – В- лимфоцитов во вторичных фолликулах лимфатических узлов) проводили с помощью иммунопероксидазного метода на срезах лимфатических узлов (толщиной 4-5 мкм) с использованием молекулярного биомаркера Ki 67 (DAKO), который является показателем пролиферативной активности клеток и идентифицирует ядерный антиген, присутствующий на всех стадиях клеточного цикла, кроме G0. Пролиферативную активность В-лимфоцитов во вторичных лимфатических фолликулах лимфатических узлов оценивали по индексу пролиферации (ИП,%), который представляет собой долю Ki-67-позитивных клеток в общей популяции клеток вторичных лимфатических фолликулов лимфатических узлов, при подсчете 100 клеток в 10 рандомизированных полях зрения по методике Г.Г. Автандилова

Результаты иммуногистохимического исследования обрабатывали статистически с применением программного комплекса Microsoft Exel 7.

Результаты исследования.

Гибель животного №1 наступила на 5-е сутки, животных №№2,3,4 - 10-е сутки.

Изменения в лимфатических узлах характеризуются серозно-геморрагическим лимфаденитом. При гистологическом исследовании в лимфатических узлах животных наблюдаются лимфатические фолликулы с центрами размножения, однако в отдельных фолликулах отмечается преобладание процессов кариопикноза и кариорексиса лимфоцитов. Кроме этого, в лимфатических узлах встречаются участки с гиперплазией фолликулов, что можно рассматривать как компенсаторную реакцию. В отдельных лимфатических узлах выявлен склероз краевых синусов, лимфоцитарная инфильтрация капсулы. В перинодальной клетчатке имеются образования, состоящие из переполненных кровью кавернозных полостей с утолщенными стенками. При иммуногистохимическом исследовании пролиферативной активности клеток в лимфатических узлах выявлен антиген Ki – 67, что представлено в виде коричневого окрашивания ядер клеток. Наиболее отчетливо зона пролиферации клеток отмечается в лимфоидных фолликулах в центре размножения (рис.1).

По результатам статистической обработки индекс пролиферации (ИП, %) в лимфатических узлах у диких свиней (кабанов) варьирует от 17 % до 4%. Средний индекс пролиферации составил:

1. Нижнечелюстные лимфатические узлы: 15±0,4%;
2. Портальные лимфатические узлы: 8±0,4%;
3. Окороложелудочные лимфатические узлы: 8±0,8%;
4. Почечные лимфатические узлы: 5,5±1,3%.

Полученные данные обработаны статистически и отображены графически. На графике четко прослеживается динамическое изменения пролиферативной активности клеток в сторону уменьшения (график 1).

Селезенка синюшна, несколько увеличена в объеме, на разрезе отмечается повышенная влажность. При гистологическом исследовании обширные сливающиеся кровоизлияния с отложениями гемо-

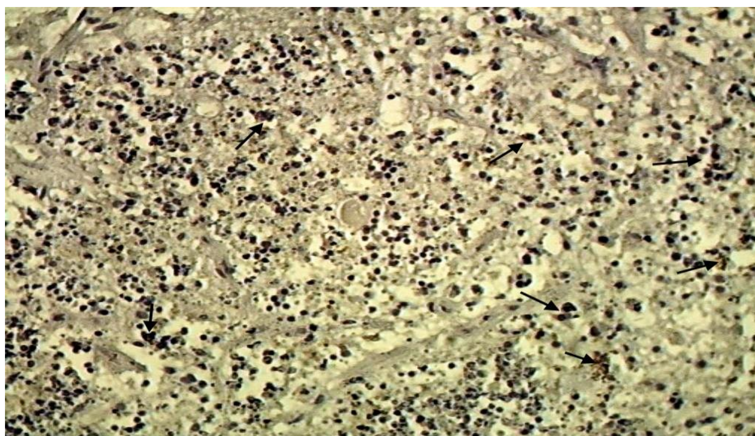


Рис.1. Околожелудочный лимфатический узел: Экспрессия маркера пролиферации Ki-67 (об.20 х ок. 15; иммунопероксидазный метод окраски).

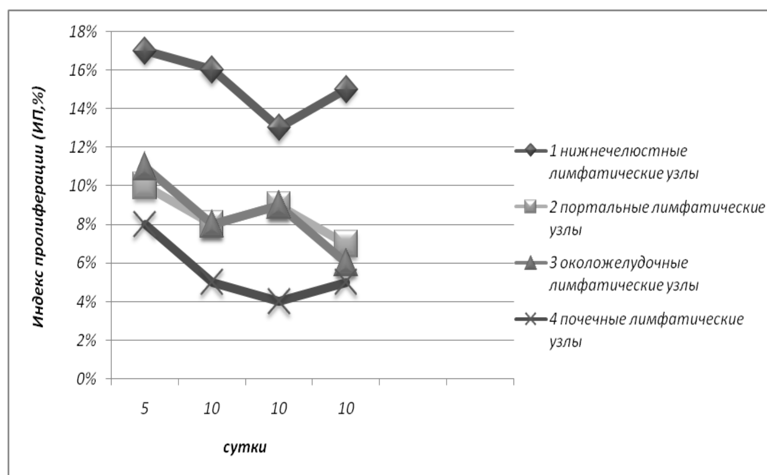


График 1. Индекс пролиферации (ИП,%) В - лимфоцитов в лимфатических узлах

сидерина, наличие тромбов в сосудах, имбибиция кровью пульпы с сохранением единичных сильно уменьшенных в размерах фолликулов, наблюдается кариопикноз и кариорексис лимфоцитов. При иммуногистохимическом исследовании пролиферативной активности клеток в селезенке выявлен антиген Ki – 67. Наиболее ярко зона пролиферации клеток отмечается в лимфоидных фолликулах в центре размножения, однако степень экспрессии Ki-67 в ядрах клеток слабо выражена и на фоне общего количества пролиферирующих клеток наблюдается преобладание клеток, находящихся в состоянии некроза и апоптоза, что свидельствует о процессах ингибирования пролиферации клеток. По результатам статистической обработки ИП,% составил: 14±0,4% (график 2):

Выводы.

1. В соматических лимфатических узлах у кабанов преобладают процессы гиперплазии фолликулов, большинство фолликулов с герминативными центрами. В висцеральных лимфоузлах отмечается как гиперплазия фолликулов, с наличием центров размножения, так и редукция фолликулов, сочетающаяся с кариопикнозом и кариорексисом лимфоцитов. При иммуногистохимическом исследовании отмечается динамическое уменьшение процесса пролиферации В – лимфоцитов.

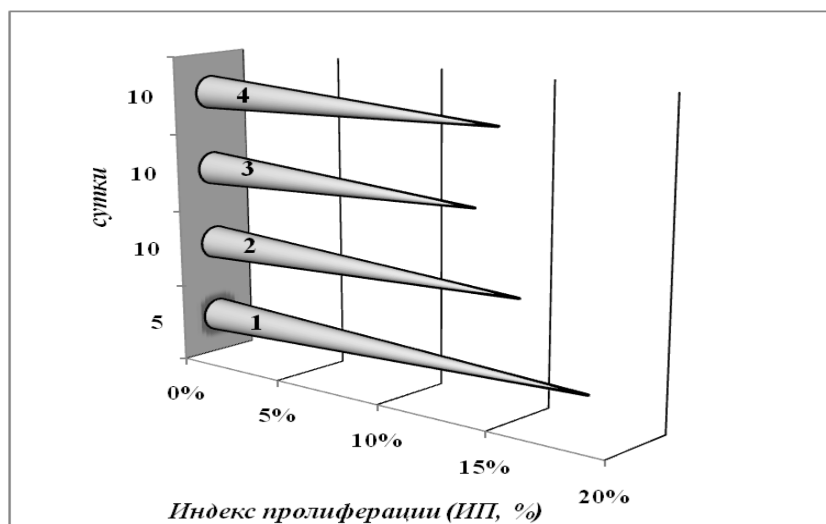


График 2: Индекс пролиферации (ИП,%) в селезенке:
1 – животное №1; 2 – животное №2; 3 – животное №3;
4 – животное №4.

2. В селезенке в начале заболевания отмечается гиперплазия фолликулов, фолликулы со слабо выраженными центрами размножения. По мере развития патологического процесса наблюдаются как гиперплазия, так и редукция фолликулов, а так же кариопикноз и кариорексис лимфоцитов. Иммуногистохимически прослеживается ингибирование пролиферации В – лимфоцитов.

Резюме: В статье представлены данные по иммуногистохимическим изменениям в лимфатических узлах и селезенке у диких свиней при экспериментальном воспроизведении африканской чумы свиней высоковирулентным полевым изолятом вируса АЧС второго генотипа, который циркулирует на территории России.

SUMMARY
The article presents data from the immunohistochemical changes of the lymph nodes and the spleen in wild boars in the experimental reproduction of african swine fever (ASF) with highly virulent field isolate of the ASF second genotype virus, which circulate on the territory of the Russian Federation.

Keywords: African Swine Fever, wild pigs (boars), the immunohistochemical changes, B – lymphocytes.

Литература

1. Белянин С.А., Васильев А.П., Колбасов Д.В. / Экспериментальное воспроизведение африканской чумы свиней у европейских диких свиней//Межведомственный тематический научный сборник «Ветеринарная Медицина». - Харьков - 2011. -№95- С. 13-15.
2. Белянин С.А., Васильев А.П., Колбасов Д.В. и др. Патогенность вируса африканской чумы свиней, циркулирующего на территории РФ// Роль ветеринарной науки в реализации продовольственной доктрины РФ: Материалы международной научно-практической конференции/ ГНУ ВНИИВВиМ.- Покров, 2011.- С.14-20
3. Коваленко Я.Р. Африканская чума свиней. // М.: Колос, 1965.- 126 с.
4. Макаров, В.В. и др. Дикий европейский кабан. Ветеринарная биология и эпизоотология //Ветеринария. – 2010. - №7. – С.28-31.
5. Макаров В.В. Африканская чума свиней. М.: Российский университет дружбы народов. 2011, 268с.

Контактная информации об авторах для переписки
Колбасов Денис Владимирович, доктор ветеринарных наук, профессор, директор ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, г. Покров
Белянин Сергей Александрович, младший научный сотрудник лаборатории Диагностики ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, г. Покров

Пронин Валерий Васильевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной патологической анатомии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ивановская государственная сельскохозяйственная академия имени академика Д.К. Беляева», г. Иваново, ул. Жаворонкова д.42, кв 78, индекс: 153027, моб.тел.:89038785022, e-mail: proninvv63@mail.ru

Корнева Галина Владимировна, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры нормальной патологической анатомии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ивановская государственная сельскохозяйственная академия имени академика Д.К. Беляева», г. Иваново

Рыжова Елена Валерьевна, кандидат ветеринарных наук, старший преподаватель кафедры нормальной патологической анатомии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ивановская государственная сельскохозяйственная академия имени академика Д.К. Беляева», г. Иваново